



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 102 08 653 A 1

51 Int. Cl. 7:
C 12 N 1/21
C 12 N 15/63
C 12 N 15/19
A 61 K 35/74

21 Aktenzeichen: 102 08 653.2
22 Anmeldetag: 28. 2. 2002
43 Offenlegungstag: 18. 9. 2003

DE 102 08 653 A 1

- 71 Anmelder:
MedInnova Gesellschaft für medizinische
Innovationen aus akademischer Forschung mbH,
35037 Marburg, DE
- 74 Vertreter:
Albrecht, Lüke & Jungblut Patentanwälte, 14195
Berlin
- 72 Erfinder:
Rapp, Ulf R., 97078 Würzburg, DE; Goebel, Werner,
97218 Gerbrunn, DE; Gentschev, Ivalyo, 97270 Kist,
DE; Fensterle, Joachim, 97204 Höchberg, DE

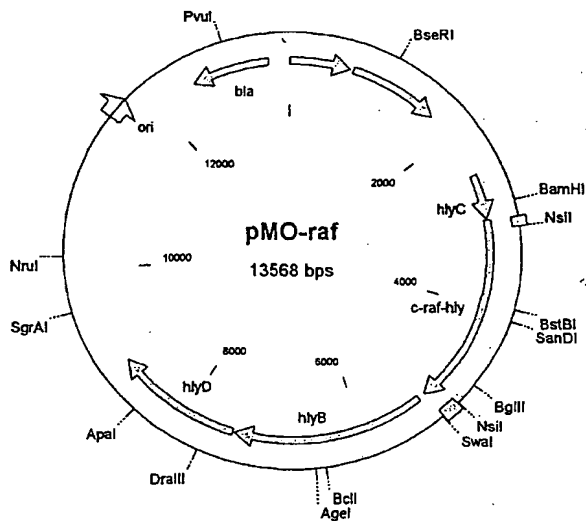
- 56 Entgegenhaltungen:
Internet-Recherche am 19.11.2002:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>, GENTSCHEV, I., MOLLENKOPF, H., SOKOLOVIC, Z., [u.a.]: Development of antigen-delivery systems, based on the Escherichia coli hemolysin secretion pathway. 1996. In: Gene, Vol. 7, S. 133-140. PubMed-Abstr.: PMID 8955639; Internet-Recherche am 19.11.2002:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>, GENTSCHEV, I., DIETRICH, G., MOLLENKOPF, H., [u.a.]: The Escherichia coli hemolysin secretion apparatus- a versatile Antigen delivery system in attenuated Salmonella. 1997. In: Berhning Inst. Mitt., Vol. 98, S. 103-113, PubMed-Abstr.: PMID 9382730;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- 54 Mikroorganismus als Träger von Nukleotidsequenzen kodierend für Zellantigene zur Behandlung von Tumoren

- 57 Die Erfindung betrifft einen Mikroorganismus mit einer Nukleotidsequenz, kodierend für ein Zellantigen, in dessen Genom folgende Komponenten eingefügt und exprimierbar sind: I) eine Nukleotidsequenz, kodierend für zumindest ein Epitop eines Antigens einer Tumorzelle und/oder eine Nukleotidsequenz für zumindest ein Epitop eines Antigens spezifisch für eine Gewebezelle, von welcher der Tumor stammt, II) optional, eine Nukleotidsequenz, kodierend für ein Protein, welches Zellen des Immunsystems stimuliert, IIIA) eine Nukleotidsequenz für ein Transportsystem, welches die Expression des Expressionsprodukts der Komponenten I) und, optional, II) auf der Außenfläche des Bakteriums und/oder die Sekretion des Expressionsprodukts der Komponente I) und, optional, der Komponente II) ermöglicht, und/oder IIIB) eine Nukleotidsequenz für ein Protein zur Lyse der Mikroorganismen im Cytosol von Säugerzellen und zur intrazellulären Freisetzung von Plasmiden, enthaltend in den lysierten Mikroorganismen, und IV) eine Aktivierungssequenz zur Expression einer oder mehrerer der Komponenten I) bis IIIB), ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus "in dem Mikroorganismus aktivierbarer, gewebezellspezifischer und nicht zellspezifischer Aktivierungssequenz", wobei jede der Komponenten I) bis IV) einfach oder mehrfach, jeweils gleich oder verschieden, eingerichtet sein kann sowie Verwendungen eines solchen Mikroorganismus zur Herstellung eines Arzneimittels.



BEST AVAILABLE COPY

DE 102 08 653 A 1

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft einen Mikroorganismus mit fremden Nukleotidsequenzen, dessen Verwendung als Arzneimittel, insbesondere Vakzin, ein Plasmid mit den fremden Nukleotidsequenzen sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Mikroorganismus.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

[0002] Hauptursache für den meist tödlichen Verlauf maligner Tumorerkrankungen ist die Unfähigkeit des körpereigenen Abwehrsystems, bösartige Krebszellen zu erkennen und zu zerstören. Krebserkrankungen gehören in den Industrieländern zu den häufigsten Krankheiten mit tödlichem Ausgang. So sterben allein in Deutschland jährlich über 210 000 Menschen an bösartigen Neubildungen (Quelle: WHO, Zahlen von 1997), was einer jährlichen Rate von über 255 Todesfällen auf 100 000 Einwohnern entspricht.

[0003] Basis dieser Erfindung sind neuere Erkenntnisse in den molekularen Mechanismen, die zu einer bösartigen Neubildung führen. Bereits in einem sehr frühen Stadium der Krebsentstehung finden charakteristische Änderungen der Kontrolle des Zellwachstum und/oder der Zelldifferenzierung statt (Ponten, *Cancer Surv* 32: 5-35., 1998). Wesentlich beteiligt an diesen Veränderungen sind Proteine der Signaltransduktion und der Zellzykluskontrolle, welche in den letzten Jahren identifiziert wurden und die alle auch Tumorentantigene darstellen.

[0004] Tumorentantigene werden grob in drei Klassen eingeteilt (Pardoll, *Nat Med* 4: 525-531., 1998): i) Tumor-spezifische Neoantigene, die in der Tumorzelle in mutierter und/oder überexprimierter Form vorliegen, wie z. B. EGF-R, HER-2, ii) Tumor-spezifische embryonale Antigene, wie Vertreter der MAGE Proteinfamilie oder CEA, iii) Tumorgewebe-spezifische Differenzierungsantigene, wie Tyrosinase, Mart-1/melan-A und gp100.

[0005] Für die Wirksamkeit eines Tumorrmpfstoffes ist eine effektive Induktion von CD8+ T-Zellen von entscheidender Bedeutung, da Tumorzellen meist keine MHC Klasse II Moleküle präsentieren und die intrazellulär vorliegenden Tumorentantigene meist MHC Klasse I restringiert sind. Bei Tumorpazienten sind die natürlicherweise vorhandenen Populationen von CD8+, zytotoxischen T-Zellen (CTL), offensichtlich nicht ausreichend, um die Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren (Jaffee, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 886: 67-72, 1999). Darüber hinaus können tumorspezifische T-Zellen oft durch unterschiedliche Mechanismen (Anergie, Toleranz, Neutralisation) das Tumorgewebe nicht effektiv angreifen (Smyth et al., *Nat Immunol* 2: 293-299., 2001). Ein erfolgreicher Tumorrmpfstoff muss daher diese Anergie oder Toleranz durchbrechen und eine ausreichende Zahl von aktivierten, spezifischen CTL sowie auch von spezifischen Antikörpern induzieren. Die Rolle von spezifischen Antikörpern zeigt sich bei dem erfolgreichen Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen Tumorentantigene der Gruppe (a), wie dem bereits kommerziell verfügbaren Herceptin, einem mAb gegen HER-2 (Colomer et al., *Cancer Invest* 19: 49-56., 2001).

[0006] Es ist bereits bekannt, dass sich attenuierte intrazelluläre Bakterien als Impfstoffträger gegen bestimmte bakterielle Infekte eignen, die vor allem durch eine so genannte Th1 Immunantwort bekämpft werden können (Hess and Kaufmann, *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 23: 165-173, 1999). Diese Antwort zeichnet sich durch CTL sowie der Anwesenheit spezifischer IFN- γ sekretieren-

der CD4+ T-Zellen (auch T-Helferzellen, Th) aus (Abbas et al., *Nature* 383: 787-793, 1996). Andere Gruppen haben gezeigt, dass rekombinante Bakterien gegen einen heterologen Tumor schützen können (Medina et al., *Eur J Immunol* 29: 693-699., 1999; Pan et al., *Cancer Res* 59: 5264-5269., 1999; Woodlock et al., *J Immunother* 22: 251-259., 1999; Paglia et al., *Blood* 92: 3172-3176., 1998; Paglia et al., *Eur J Immunol* 27: 1570-1575., 1997; Pan et al., *Nat Med* 1: 471-477., 1995; Pan et al., *Cancer Res* 55: 4776-4779., 1995). In diesen Fällen wurden allerdings Tiere gegen ein Surrogat-Antigen immunisiert, und anschließend Tumorzellen appliziert, welche dieses Antigen exprimieren.

[0007] Diese Tumorsysteme sind mit klinischen Tumoren jedoch nicht zu vergleichen, da in diesen Modellen keine Toleranz für das Tumorentantigen bestand.

[0008] Eine stattliche Anzahl unterschiedlicher Tumorsvakzinen wurde bereits klinisch geprüft. Bislang konnte jedoch mit keiner Tumorsvakzine und keinem Vakzinierungsverfahren ein Durchbruch in der Behandlung von Tumorerkrankungen erzielt werden. Vor diesem Hintergrund besteht weiterhin ein äußerst großer Bedarf an neuen Tumorthera-

[0009] Es ist bekannt, Expressionsprodukte von in Bakterien eingeführten Nukleinsäuresequenzen auf der Zellmembran dieser Bakterien zu exprimieren oder von diesen Bakterien sekretieren zu lassen. Basis dieser Technik ist das *Escherichia coli* Hämolysinsystems HlyAs, welches den Prototyp eines Typ I Sekretionssystems von gramnegativen Bakterien darstellt. Mit Hilfe des HlyAs wurden Sekretionsvektoren entwickelt, die eine effiziente Ausschleusung von Proteinantigenen in *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* und *Vibrio cholerae* ermöglichen. Derartige Sekretionsvektoren enthalten die cDNA eines beliebigen Proteinantigens gekoppelt an die Nukleotidsequenz für das HlyA-Signalpeptid, für den Hämolysin-Sekretionsapparat, hlyB und hlyD und den hly-spezifischen Promoter. Mit Hilfe dieses Sekretionsvektors kann ein Protein auf der Oberfläche dieses Bakteriums exprimiert werden. Derartig genetisch modifizierte Bakterien induzieren als Vakzinen einen weit aus stärkeren Immunschutz als Bakterien, in welchen das von der eingeführten Nukleinsäure exprimierte Protein zellintern verbleibt (Donner et al EP 1015023 A, Gentschev et al. *Gene*, 179: 133-140, 1996; Vaccine 19: 2621-2618, 2001, Hess et al PNAS 93: 1458-1463, 1996). Nachteil dieses Systems ist jedoch, dass durch Verwendung des hly-spezifischen Promoters die Menge des auf der Außenfläche des Bakteriums exprimierten Proteins äußerst gering ist.

[0010] Eine Technik zur Einschleusung von Plasmid-DNA in Säugerzellen durch Trägerbakterien wie *Salmonella* und *Listeria monocytogenes* wurde entwickelt. In diesen Plasmiden enthaltene Gene konnten in den Säugerzellen auch dann exprimiert werden, wenn sie unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promoters standen. In *Listeria monocytogenes* Keime wurden Plasmide eingeführt, die eine Nukleotidsequenz für ein beliebiges Antigen unter der Kontrolle eines beliebigen eukaryontischen Promoters enthalten. Durch Einführung der Nukleotidsequenzen für ein spezifisches Lysis-Gen wurde bewirkt, dass sich die *Listeria monocytogenes* Keime im Zytosol der Antigen-präsentierenden Zelle auflösen und ihre Plasmide freisetzen, was zur anschließenden Expression, Prozessierung und Präsentation der plasmidkodierten Proteine führt und die Immunogenität dieser Proteine deutlich steigert (Dietrich et al. *Nat. Biotechnol* 16: 181-185, 1998; Vaccine 19: 2506-2512, 2001).

[0011] Virulenz-attenuierte Varianten von Bakterien, die sich intrazellulär ansiedeln, wurden entwickelt. Beispielsweise wurden von *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* sv. Typhimurium und Typhi, sowie *Mycobacterium*

bovis derartige Varianten bereits als gut verträgliche Lebendimpfstoffe gegen Typhus und Tuberkulose eingesetzt. Diese Bakterien, einschließlich ihrer abgeschwächten Mutanten sind generell immunstimulierend und können eine gute zelluläre Immunantwort auslösen. Beispielsweise stimuliert *L. monocytogenes* in besonderem Maße über die Aktivierung von TH1 Zellen die Proliferation von zytotoxischen Lymphozyten. Diese Bakterien liefern sezernierte Antigene direkt in das Cytosol Antigenpräsentierender Zellen (APC; Makrophagen und Dendritische Zellen), die ihrerseits die ko-stimulierenden Moleküle exprimieren und eine effiziente Stimulierung von T-Zellen auslösen. Die Listerien werden zum Teil in phagosomalen Kompartimenten abgebaut und die von diesen Trägerbakterien produzierten Antigene können daher einerseits über MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden und damit zur Induktion von T-Helferzellen führen. Andererseits replizieren die Listerien nach Freisetzung aus dem Phagosom im Cytosol von APCs; von diesen Bakterien produzierte und sezernierte Antigene werden deshalb bevorzugt über den MHC Klasse I-Weg präsentiert, wodurch CTL Antworten gegen diese Antigene induziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Interaktion der Listerien mit Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK) und Neutrophilen Granulozyten die Expression solcher Cytokine (TNF-alpha, IFN-gamma, IL-2, IL-12; Unanue, Curr. Opin. Immunol, 9: 35-43, 1997; Mata and Paterson, J Immunol 163: 1449-14456, 1999) induziert wird, für welche eine antitumorale Wirksamkeit nachgewiesen wurde. So konnte durch die Verabreichung von *L. monocytogenes*, welche transduziert waren zur Expression von Tumorantigenen, antigenspezifisch das Wachstum von experimentellen Tumoren gehemmt werden (Pan et al Nat Med 1: 471-477, 1995, Cancer Res 59: 5264-5269, 1999; Voest et al. Natl Cancer Inst 87: 581-586, 1995; Beatty and Paterson, J Immunol 165: 5502-5508, 2000).

[0012] Virulenz-attenuierte *Salmonella enterica* Stämme, in welche Nukleotidsequenzen kodierend für Tumorantigene eingeführt worden waren, konnten als Tumorantigen-exprimierende bakterielle Träger nach oraler Verabreichung einen spezifischen Schutz gegen unterschiedliche experimentelle Tumoren bewirken (Medina et al., Eur J Immunol 30: 768-777, 2000, Zoller und Christ J Immunol 166: 3440-34450, 2001; Xiang et al., PNAS 97: 5492-5497, 2000).

[0013] Rekombinante *Salmonella* Stämme waren auch als prophylaktische Vakzine gegen Virusinfektionen (HPV) (Benyacoub et al., Infect Immun 67: 3674-3679, 1999) und zur therapeutischen Behandlung eines durch ein Tumovirus (HPV) immortalisierten Maustumors wirksam (Revaz et al., Virology 279: 354-360, 2001).

Technisches Problem der Erfindung

[0014] Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, ein Arzneimittel anzugeben, welches insbesondere in der Tumorphylaxe und Tumorthherapie eine verbessertes Vakzin mit Durchbrechung der Immuntoleranz gegenüber Tumoren darstellt.

Grundkonzeption der Erfindung

[0015] Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung einen Mikroorganismus mit einer Nukleotidsequenzen kodierend für ein Zellantigen, in dessen Genom folgende Komponenten eingefügt und exprimierbar sind: I) eine Nukleotidsequenz, kodierend für zumindest ein Epitop eines Antigens oder mehrerer Antigene einer Tumorzelle und/oder eine Nukleotidsequenz für zumindest ein Epitop

eines Antigens oder mehrerer Antigene spezifisch für eine Gewebezelle, von welcher der Tumor stammt, II) optional, eine Nukleotidsequenz, kodierend für ein Protein, welches Zellen des Immunsystems stimuliert, IIIA) eine Nukleotidsequenz für ein Transportsystem, welches die Expression des Expressionsprodukts der Komponenten I) und, optional, II) auf der Außenfläche des Bakteriums und/oder die Sekretion des Expressionsprodukts der Komponente I) und, optional, der Komponente II) ermöglicht, und/oder IIIB) eine Nukleotidsequenz für ein Protein zur Lyse der Mikroorganismen im Cytosol von Säugerzellen und zur intrazellulären Freisetzung von Plasmiden enthalten in den lysierten Mikroorganismen, und IV) eine Aktivierungssequenz zur Expression einer oder mehrerer der Komponenten I) bis IIIB) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "in dem Mikroorganismus aktivierbare, gewebezellspezifische, und nicht zellspezifische Aktivierungssequenz", wobei jede der Komponenten I) bis IV) einfach oder mehrfach, jeweils gleich oder verschieden, eingerichtet sein kann sowie Verwendungen eines solchen Mikroorganismus zur Herstellung eines Arzneimittels.

[0016] Gegenstand der Erfindung sind somit Mikroorganismen, welche Träger von Nukleotidsequenzen darstellen, die für Zellantigene kodieren, welche wiederum auf der äußeren Membran der Mikroorganismen exprimiert oder sekretiert werden und die Verwendung dieser Mikroorganismen für die Durchbrechung der Immuntoleranz gegen Tumoren, und neue Tumorstoffe, welche beinhalten Mikroorganismen als Träger von Nukleotidsequenzen kodierend für Zellantigene von Normalzellen und/oder von Tumorzellen. Mit der Erfindung wird letztendlich eine gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion ausgelöst.

[0017] Im Einzelnen enthalten die erfindungsgemäßen Mikroorganismen folgende Komponenten: I) mindestens eine Nukleotidsequenz kodierend für mindestens ein Epitop mindestens eines Antigens mindestens eines Zellproteins einer Tumorzelle und/oder wahlweise mindestens eine Nukleotidsequenz für mindestens ein Epitop mindestens eines Antigens spezifisch für die Gewebezelle, von welchem der Tumor stammt, II) wahlweise mindestens eine Nukleotidsequenz für mindestens ein Protein, welches Zellen des Immunsystems stimuliert, IIIA) mindestens eine Nukleotidsequenz für ein Transportsystem zur membranständigen Expression oder zur Sekretion des von der Komponente I) kodierten Zellantigens und zur Sekretion des von der Komponente II) kodierten immunstimulierenden Proteins, IIIB) wahlweise eine Nukleotidsequenz für ein Lysin, welches den Mikroorganismus im Cytosol lysiert, sodass im Mikroorganismus enthaltene Plasmide in das Cytosol freigesetzt werden, IV) mindestens eine Nukleotidsequenz für eine im Mikroorganismus aktivierbare oder zellunspezifisch, tumorzellspezifisch, gewebezellspezifisch oder funktionsspezifisch aktivierbare Aktivierungssequenz zur Expression der Komponente I) und II).

Bevorzugte Ausführungsformen

[0018] Folgend werden die Komponenten eines erfindungsgemäßen Mikroorganismus im Einzelnen beschrieben.

Komponente I

[0019] Komponente I) stellt mindestens eine Nukleotidsequenz für mindestens ein Epitop mindestens eines Antigens mindestens eines Zellproteins oder mindestens eines onkogen mutierten Zellproteins einer Tumorzelle dar. Die onkogene Mutation des Zellproteins kann einen Verlust oder ei-

nen Gewinn seiner ursprünglichen zellulären Funktionen bewirkt haben. Desweiteren kann dieses Zellprotein ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus "Rezeptormoleküle oder Teile hiervon, und zwar extrazelluläre, transmembrane oder zellinterne Teile der Rezeptoren; Adhäsionsmoleküle oder Teile hiervon und zwar extrazelluläre, transmembrane oder zellinterne Teil der Adhäsionsmoleküle; Proteine der Signaltransduktion; Proteine der Zellzykluskontrolle; Differenzierungsproteine; embryonale Proteine; und virusinduzierte Proteine". Derartige Zellantigene übernehmen in der Zelle die Regelung des Zellwachstums und der Zellteilung und werden auf der Zellmembran von normalen Zellen präsentiert, beispielsweise durch das MHC-Klasse I Molekül. In Tumorzellen sind diese Zellantigene häufig überexprimiert oder spezifisch mutiert. Derartige Mutationen können Funktionseinschränkungen von Onkogensuppressoren oder die Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen zur Folge haben und alleine oder gemeinschaftlich mit Überexpressionen wesentlich am Tumorstadium beteiligt sein. Derartige Zellantigene werden auf der Membran von Tumorzellen präsentiert und stellen demnach Antigene auf Tumorzellen dar, jedoch ohne eine die Tumorkrankheit des Patienten beeinflussende Immunreaktion auszulösen. Von Rapp (US-5,156,841) wurde bereits die Verwendung von Onkoproteinen, d. h. von Expressionsprodukten der Onkogene als Immunogen für Tumorstadien beschrieben. Auf diese Literaturstelle wird ausdrücklich Bezug genommen. [0020] Beispiele für Zellantigene und deren onkogene Mutationen gemäß der Erfindung sind i) Rezeptoren, wie beispielsweise Her-2/neu, Androgen-Rezeptor, Oestrogen-Rezeptor, Midkine-Rezeptor, EGF-Rezeptor, ERBB2, ERBB4, TRAIL-Rezeptor, FAS, TNFalpha-Rezeptor, ii) signaltransduzierende Proteine und deren onkogene Mutationen wie beispielsweise c-Raf (Raf-1), A-Raf, B-Raf, Ras, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, Al, Bax, BAD, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Hrk, Bcr/abl, Myb, C-Met, IAP1, IAO2, XIAP, ML-IAP LIVIN, Survivin, APAF-1; iii) Proteine der Zellzykluskontrolle und deren onkogene Mutationen wie beispielsweise Cyclin-D(1-3), -E, -A, -B, -H, Cdk-1, -2, -4, -6, -7, Cdc25C, P16, p15, p21, p27, p18, pRb, p107, p130, E2F (1-5), GAAD45, MDM2, PCNA, ARF, PTEN, APC, BRCA, P53 und Homologe, iv) Transkriptionsfaktoren und deren onkogene Mutationen wie beispielsweise C-Myc, NFkB, c-Jun, ATF-2, Spl, v) embryonale Proteine, wie beispielsweise carcinoembryonales Antigen, alpha-Fetoprotein, Mage, PSCA, vi) Differenzierungsantigene, wie beispielsweise Mart, Gp100, Tyrosinase, GRP, TCF-4, vii) virale Antigene wie beispielsweise von folgenden Viren: HPV, HCV, HPV, EBV, CMV, HSV.

[0021] Alternativ oder zusätzlich kann Komponente I) mindestens eine Nukleotidsequenz für mindestens ein Antigen spezifisch für eine normale Gewebezelle, von welcher der jeweilige Tumor abstammt, darstellen. Derartige spezifische Antigen sind beispielsweise i) Rezeptoren wie beispielsweise Androgenrezeptoren, Oestrogenrezeptoren, Lactoferrinrezeptor, ii) Differenzierungsantigene wie beispielsweise basisches Myelin, alpha-Lactalbumin, GFAP, PSA, Fibrillary acid Protein, Tyrosinase, EGR-1, MUC1.

Komponente II

[0022] Komponente II) stellt mindestens eine Nukleotidsequenz für mindestens ein Protein dar, welches Zellen des Immunsystems stimuliert. Durch die Wahl des Proteins kann die Immunreaktion auf das Expressionsprodukt von Komponente I) verstärkt und/oder mehr zur Aktivierung von Th1 Zellen (für die zelluläre Immunreaktion) oder zur Aktivierung von Th2 Zellen (für die humorale Immunreaktion) aus-

gerichtet werden. Immunstimulierende Proteine sind beispielsweise i) Cytokine wie M-CSF, GM-CSF, G-CSF, ii) Interferone wie IFN-alpha, -beta, gamma, iii) Interleukine wie IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, Human Leukemia inhibitory factor (LIF), iv) Chemokine wie Rantes, Monocyte chemotactic and activating factor (MCAF), Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1-alpha, -beta), Neutrophil activating Protein-2 (NAP-2), IL-8.

Komponente IIIA

[0023] Komponente IIIA) ist mindestens eine Nukleotidsequenz, kodierend für mindestens ein Transportsystem, welches die Expression der Expressionsprodukte der Komponenten I) und, optional, II) auf die Außenfläche des Mikroorganismus ermöglicht. Die jeweilige Komponente kann hierbei wahlweise entweder sekretiert werden oder auf der Membran des Mikroorganismus, d. h. membranständig exprimiert werden. Derartige Transportsysteme sind beispielsweise i) das Hämolysintransportsignal von E. coli (Nukleotidsequenzen enthaltend HlyA, HlyB und HlyD unter der Kontrolle des hly-spezifischen Promoters); folgende Transportsignale sind zu verwenden: für die Sekretion – das C-terminale HlyA-Transportsignal, in Gegenwart von HlyB und HlyD Proteinen; für die membranständige Expression – das C-terminale HlyA-Transportsignal, in Gegenwart vom HlyB-Protein, ii) das Hämolysintransportsignal von E. coli (Nukleotidsequenzen enthaltend HlyA, HlyB und HlyD unter der Kontrolle eines nicht hly-spezifischen bakteriellen Promoters), iii) das Transportsignal für das S-layer Protein (Rsa A) von *Caulobacter crescentus*; folgende Transportsignale sind zu verwenden: für die Sekretion und für die membranständige Expression – das C-terminale RsaA-Transportsignal, iv) das Transportsignal für das TolC-Protein von *Escherichia coli*; folgende Transportsignale sind zu verwenden: für die membranständige Expression – das N-terminale Transportsignal von TolC (das integrale Membranprotein TolC von E. coli ist ein multifunktionelles, porenbildendes Protein der äußeren Membran von E. coli, das neben Funktionen wie z. B. der Aufnahme von Colicin E1 (Morona et al., J Bacteriol 153: 693–699., 1983) und der Sekretion von Colicin V (Fath et al., J Bacteriol 173: 7549–7556., 1991) auch als Rezeptor für den U3-Phagen dient (Austin et al., J Bacteriol 172: 5312–5325., 1990); dieses Protein findet sich nicht nur in E. coli, sondern in einer Vielzahl von Gram negativen Bakterien (Wiener, Structure Fold Des 8: 171–175., 2000); die Lokalisation in der äußeren Membran und das verbreitete Vorkommen machen TolC zu einem idealen Kandidaten, heterologe Antigene zu präsentieren um z. B. eine Immunantwort auszulösen).

Komponente IIIB

[0024] Komponente IIIB) ist eine Nukleotidsequenz, kodierend für mindestens ein lytisches Protein, welches im Cytosol einer Säugerzelle exprimiert wird und den Mikroorganismus lysiert zur Freisetzung der Plasmide im Cytosol der Wirtszelle. Derartige lytische Proteine (Endolysine) sind beispielsweise Listerien-spezifische Lysis-Proteine wie z. B. PLY551 (Loessner et al Mol Microbiol 16: 1231–41, 1995) und/oder das Listeria-spezifische Holm unter der Kontrolle eines listeriellen Promoters.

[0025] Eine bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung ist die Kombination unterschiedlicher Komponenten IIIB), beispielsweise die Kombination eines Lysis-Proteins mit dem Holm.

[0026] Die Komponenten IIIA und/oder IIIB können konstitutiv aktiv sein.

Komponente IV

[0027] Komponente IV) stellt mindestens eine Nukleotidsequenz für mindestens eine Aktivierungssequenz zur Expression der Komponente I) und, optional, II) dar.

[0028] Ist die Expression membranständig auf der Außenfläche des Mikroorganismus, so ist die Aktivierungssequenz vorzugsweise so auszuwählen, dass sie im Mikroorganismus aktivierbar ist. Derartige Aktivierungssequenzen sind beispielsweise: i) konstitutiv aktive Promotorregionen, wie die Promotorregion mit "Ribosomal binding site" (RBS) des beta-lactamase Gens von *E. coli* oder des tetA gens (Busby and Ebright, Cell 79: 743-746., 1994), ii) induzierbare Promotoren, bevorzugt Promotoren, die nach Aufnahme in die Zelle aktiv werden. Zu diesen gehört der actA Promoter von *L. monocytogenes* (Dietrich et al., Nat. Biotechnol. 16: 181-185, 1998) oder der pagC Promoter von *S. typhimurium* (Bumann, Infect Immun 69: 7493-7500., 2001).

[0029] Werden die Plasmide vom Mikroorganismus nach dessen Lyse in das Cytosol der Zelle freigesetzt, so ist die Aktivierungssequenz nichtzellspezifisch, gewebezellspezifisch, zellzyklusspezifisch oder funktionsspezifisch. Vorzugsweise werden Aktivierungssequenzen gewählt, welche in Makrophagen, Dendritischen Zellen und Lymphozyten besonders aktiviert werden.

[0030] Mikroorganismen im Sinne dieser Erfindung sind Viren, Bakterien oder einzellige Parasiten, welche zur Übertragung von, dem Mikroorganismus fremden Nukleotidsequenzen üblicherweise benutzt werden.

[0031] In einer besonderen Ausformung dieser Erfindung stellen die Mikroorganismen gram-positive oder gram-negative Bakterien dar, vorzugsweise Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*.

[0032] Vorzugsweise werden solche Bakterien verwendet, welche in ihrer Virulenz attenuiert sind.

[0033] Die Komponenten entsprechend der Erfindung werden in die Mikroorganismen eingeführt mit den dem Fachmann bekannten Methoden. Stellen die Mikroorganismen Bakterien dar, so werden die Komponenten in Plasmide eingefügt und die Plasmide in die Bakterien übertragen. Die hierzu geeigneten Techniken und Plasmide sind dem Fachmann hinreichend bekannt.

[0034] Gegenstand der Erfindung sind Arzneimittelzubereitungen enthaltend die erfindungsgemäßen Mikroorganismen oder aber Membranhüllen dieser Mikroorganismen. Die Herstellung dieser Membranhüllen erfolgt beispielsweise nach der in der Patentanmeldung EP-A-0 540 525 beschriebenen Methode. Derartige Arzneimittelzubereitungen sind beispielsweise Suspensionen der erfindungsgemäßen Mikroorganismen in den dem Pharmazeuten geläufigen Lösungen, geeignet zur Injektion.

[0035] Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verabreichung einer Arzneimittelzubereitung enthaltend die erfindungsgemäßen Mikroorganismen. Die Verabreichung erfolgt lokal oder systemisch, beispielsweise in die Epidermis, in die Subkutis, in die Muskulatur, in eine Körperhöhle, in ein Organ, in den Tumor oder in den Blutkreislauf.

[0036] Ein besonderer Gegenstand dieser Erfindung ist die perorale oder rektale Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneizubereitung für die Prophylaxe und/oder Therapie einer proliferativen Erkrankung. Die Verabreichung kann einmalig oder mehrmalig erfolgen. Bei jeder Verabreichung werden im Bereich von 10 bis 100% erfindungsgemäße Mikroorganismen verabreicht. Falls die Verabreichung dieser Anzahl an den erfindungsgemäßen Mikroorganismen keine ausreichende Immunreaktion bewirkt, ist die zu injizierende Anzahl zu steigern.

[0037] Nach Verabreichung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen wird die Toleranz für eine Zelle, die Komponente I) präsentiert, beispielsweise für eine Tumorzelle, oder für eine Gewebezelle, von welcher der Tumor stammt, durchbrochen und eine gegen den Tumor und/oder gegen dessen Gewebezellen gerichtete zytotoxische Immunreaktion ausgelöst.

[0038] Je nach Wahl der Komponente I) ist diese zytotoxische Immunreaktion entweder ausschließlich gegen den Tumor gerichtet oder auch gegen die Tumorzellen einschließlich der Gewebezellen, von welchem die Tumorzellen abstammen.

[0039] Gegenstand der Erfindung ist somit die Verabreichung einer erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitung zu Prophylaxe oder Therapie einer proliferativen Erkrankung. Zu den proliferativen Erkrankungen sind Tumorerkrankungen, Leukämien, viral verursachte Erkrankungen, chronische Entzündungen, Abstoßungen transplanterter Organe und Autoimmunerkrankungen zu zählen.

[0040] In einer besonderen Ausformung dieser Erfindung, bei welcher die Komponente I) mindestens ein Zellantigen darstellt, welches exprimiert wird von einer Tumorzelle und den Gewebezellen, von welchen der Tumor abstammt, wird die erfindungsgemäße Arzneimittelzubereitung zur Prophylaxe oder Therapie eines Tumors der Schilddrüse, der Mamma, des Magens, der Niere, des Ovars, der Muttermale, der Prostata, der Cervix oder der Harnblase verabreicht.

[0041] Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Induktion einer Immunantwort in B x B Mäusen durch Immunisierung mit c-Raf exprimierenden Salmonellen

[0042] Raf ist eine normalerweise zytosolische Serin/Threonin Kinase (PSK), welche im Zusammenspiel mit anderen Proteinen von Signalkaskaden das Zellwachstum und -überleben kontrolliert (Kerkhoff and Rapp, Oncogene 17: 1457-1462., 1998; Troppmair and Rapp, Recent Results Cancer Res 143: 245-249., 1997). Eine Bindung eines Wachstumsfaktor an einen entsprechenden Rezeptor führt normalerweise über eine Aktivierung von Ras, der anschließenden Aktivierung von Raf über mehrere Phosphorylierungsschritte über die PSK- und Tyrosin Kinase MEK und der PSK ERK zu einer Aktivierung der Replikationsmaschinerie im Zellkern (Kerkhoff and Rapp, Oncogene 17: 1457-1462., 1998). Das erste Glied dieser Kette, das kleine G-Protein Ras, liegt in ca. 30% aller menschlichen Tumore verändert vor (Zachos and Spandidos, Crit Rev Oncol Hematol 26: 65-75., 1997). Raf ist ein Effektor von Ras und liegt in einer Vielzahl von menschlichen Tumoren überexprimiert vor (Naumann et al., Recent Results Cancer Res 143: 237-244., 1997).

[0043] Für den Test im Mausmodell werden transgene Mäuse verwendet, welche das vollständige Molekül oder die konstitutiv aktive Kinasedomäne (B x B) überexprimieren (Kerkhoff et al., Cell Growth Differ 11: 185-190., 2000). Damit entwickeln diese Mäuse spontan nach ca. einem halben Jahr Lungentumore.

[0044] Für die Generierung der Vakzine wurde die humane c-Raf cDNA mit Hilfe von PCR "in-frame" mit HlyA in das Plasmid pMOhly 1 kloniert (Fig. 1). Anschließend wurde das Plasmid pMO-Raf in attenuierte Salmonellen (*S. typhi* murium SL7207), welche einen Defekt im aromatischen Stoffwechsel tragen, transfiziert (Hoiseith and Stocker, Nature 291: 238-239, 1981). Im Immunoblotting mit Hilfe

von Antikörpern, gerichtet gegen c-Raf konnte im Bakterienlysats wie auch im Kulturüberstand von, mit pMOhy-Raf transfizierten SL7207-Bakterien das c-Raf HlyAs Fusionsprotein nachgewiesen werden.

[0045] B x B transgene Mäuse wurden nun im Alter von 7-10 Wochen oral mit den Salmonellen immunisiert (Dosis 5×10^9), wobei die Impfung 2mal im Abstand von 5 Tagen wiederholt wurde. 45 Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte eine intravenöse Auffrischimpfung mit 5×10^5 Salmonellen. Zur Kontrolle wurde Mäusen nackte c-Raf kodierende DNA intramuskulär verabreicht.

[0046] 5-7 Tage nach der letzten Immunisierung wurden nun Serumproben entnommen und mit Hilfe eines WESTERN-Blots die Antikörperantwort analysiert. Hierzu wurde das 1 : 200 verdünnte Serum gegen Membranen mit aufgetrenntem Protein und geblottetem Protein von c-Raf transfizierten oder nicht transfizierten Bakterien hybridisiert. Der Nachweis der gebundenen Serumantikörper erfolgte mit Hilfe von Antikörpern spezifisch für Maus-IgG. In Gegensatz zu den Kontrollmäusen konnten in Mäusen immunisiert mit pMohly-Raf transfizierten SL7207 c-Raf spezifische Antikörper des Isotyps IgG induziert werden. Damit ist gezeigt, dass eine Immunisierung mit den beschriebenen Salmonellen die Selbst-Toleranz durchbrechen kann und CD4+ T-Zellen, welche für den Antikörper Isotypenwechsel zu IgG notwendig sind, induziert.

[0047] Zur Analyse der CD8+ T-Zellantwort wurden C57BL-6 Mäuse nach dem gleichen Protokoll immunisiert. 7 Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milzzellen isoliert und diese wurden mit Raf-überexprimierenden EL-4 Zellen stimuliert. 1 h nach Beginn der Stimulation wurde der vesikuläre Transport durch Brefeldin A geblockt und nach weiteren 4 h wurden die Zellen mit CD8 und IFN- γ spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Mittrucker et al., Infect Immun 70: 199-203., 2002). Nur in einer pMO-Raf immunisierten Maus konnte eine Raf-spezifische Antikörperantwort detektiert werden.

[0048] Zum Nachweis der tumoriziden Aktivität wurden 10, 12 und 14 Monate alte inunisierte und nicht immunisierte B x B Mäuse getötet und die Lungenmasse gewogen. Die Lungenmasse ist ein direktes Maß für die Größe des Tumors. In der Gruppe, immunisiert mit SL-pMO-Raf waren nach 14 Monaten deutlich häufiger Mäuse anzutreffen mit einer Reduktion der Lungemasse, als in den Kontrollgruppen einschließlich derjenigen Gruppe, welche mit nackter DNA kodierend für c-Raf (SL-pCMV-raf) immunisiert worden war. Normalerweise ist das Tumorwachstum in nicht behandelten Tieren nicht umkehrbar (Kerkhoff et al., Cell Growth Differ 11: 185-190., 2000). Diese Daten zeigen somit, dass in diesem Experiment eine Impfung mit SL-pMO-Raf Tiere vor der Entstehung von Tumoren schützen konnte und die hier beschriebene Erfindung als Tumorstoffimpfung geeignet ist.

[0049] Diese Experimente zeigen desweiteren, dass sich mit dem in dieser Erfindung dargestellten Trägersystem prinzipiell die Selbst-Toleranz durchbrechen und in c-Raf toleranten Tieren eine c-Raf spezifische Antikörperantwort und T-Zellantwort induzieren lässt.

[0050] Mit dem gleichen experimentellen System lassen sich als Vakzinen Salmonellen herstellen, welche Isoformen von C-Raf (wie beispielsweise B-Raf und A-Raf), mutiertes C-Raf, B-Raf oder A-Raf, Epitope von normalen oder mutiertem C-Raf, B-Raf oder A-Raf, oder Kombinationen von Epitopen von normalen und/oder mutiertem C-Raf, B-Raf oder A-Raf exprimieren. Beispiele für eine Mutation, die mit Verlust der Aktivität von Raf einhergeht, sind Mutationen der Ras-bindenden Domäne, der Kinase-Domäne und/

oder der Phosphorylierungsstellen.

Beispiel 2

5 Induktion einer Immunantwort in BALB/c Mäusen durch Immunisierung mit PSA exprimierenden Salmonellen

[0051] Die Existenz gewebsspezifischer Antigene, insbesondere solcher, die in erhöhtem Maße von Tumorzellen synthetisiert und exprimiert werden, bildet neben der diagnostischen Verwertbarkeit dieser Marker auch einen möglichen Angriffspunkt für therapeutische Ansätze. Für das Prostatakarzinom sind bislang drei nennenswerte Antigene identifiziert worden: PSA (Prostata spezifisches Antigen), PSMA (Prostata spezifisches Membran-Antigen) und PSCA (Prostata Stamm-Zell-Antigen). Während PSA bereits schon in frühen Tumorformen überexprimiert vorliegt (Watt et al., Proc Natl Acad Sci USA 83: 3166-3170., 1986; Wang et al., Prostate 2: 89-96., 1981) und damit zur Karzinomdiagnostik beiträgt (Labrie et al., J Urol 147: 846-851; discussion 851-842., 1992), ist die PSCA-Expression meist erst im lokal fortgeschrittenen, entdifferenzierten und metastasierten Tumorstadium erhöht (Gu et al., Oncogene 19: 1288-1296., 2000; Reiter et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 1735-1740., 1998). Die Organspezifität macht sowohl PSA als auch PSCA zu einem potentiellen Zielantigen bei der Entwicklung von Immuntherapien gegen das Prostatakarzinom (Reiter et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 1735-1740., 1998; Hodge et al., Int J Cancer 63: 231-237., 1995; Armbruster, Clin Chem 39: 181-195., 1993).

[0052] In diesem Versuch sollte gezeigt werden, ob PSA sezernierende Salmonellen auf der Basis des Vektors pMOHLY 1 in BALB/c Mäusen eine Immunantwort induzieren können. Dazu wurden zunächst mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) zwei NsiI-Schnittstellen in die c-DNA-Sequenz von PSA eingeführt, um eine "in-frame"-Insertion des amplifizierten Fragments in den Zielvektor zu ermöglichen. Für die Amplifikation wurde ein Fragment von 645 Basenpaaren (bp) ausgewählt. Als Primer dienten 5'-GTGGATTG-GTGATGCATCCCTCATC-3' und 5'-CAGGGCACATGCATCACTGCCCA-3'. Das PCR-Produkt wurde zunächst "blunt-end" in den Vektor pUC18 kloniert und später über NsiI-Schnittstellen mit dem Zielvektor pMOHLY1 ligiert. Die korrekte Insertion wurde mittels Restriktionsverdau kontrolliert und durch Sequenzierung bestätigt (Fig. 2).

[0053] Mit diesem Salmonellenstamm werden nun BALB/c Mäuse dreimal im Abstand von 3 Wochen mit einer Dosis von 1×10^7 nasal immunisiert. Die Immunantwort wird mit WESTERN-Blot Analysen und intrazellulärer Zytokinfärbung nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Mikroorganismus mit einer Nukleotidsequenzen kodierend für ein Zellantigen, in dessen Genom folgende Komponenten eingefügt und exprimierbar sind:

I) eine Nukleotidsequenz, kodierend für zumindest ein Epitop eines Antigens oder mehrerer Antigene einer Tumorzelle und/oder eine Nukleotidsequenz für zumindest ein Epitop eines Antigens oder mehrerer Antigene spezifisch für eine Gewebezelle, von welcher der Tumor stammt,

II) optional, eine Nukleotidsequenz, kodierend für ein Protein, welches Zellen des Immunsystems stimuliert,

IIIa) eine Nukleotidsequenz für ein Transportsystem, welches die Expression des Expressionspro-

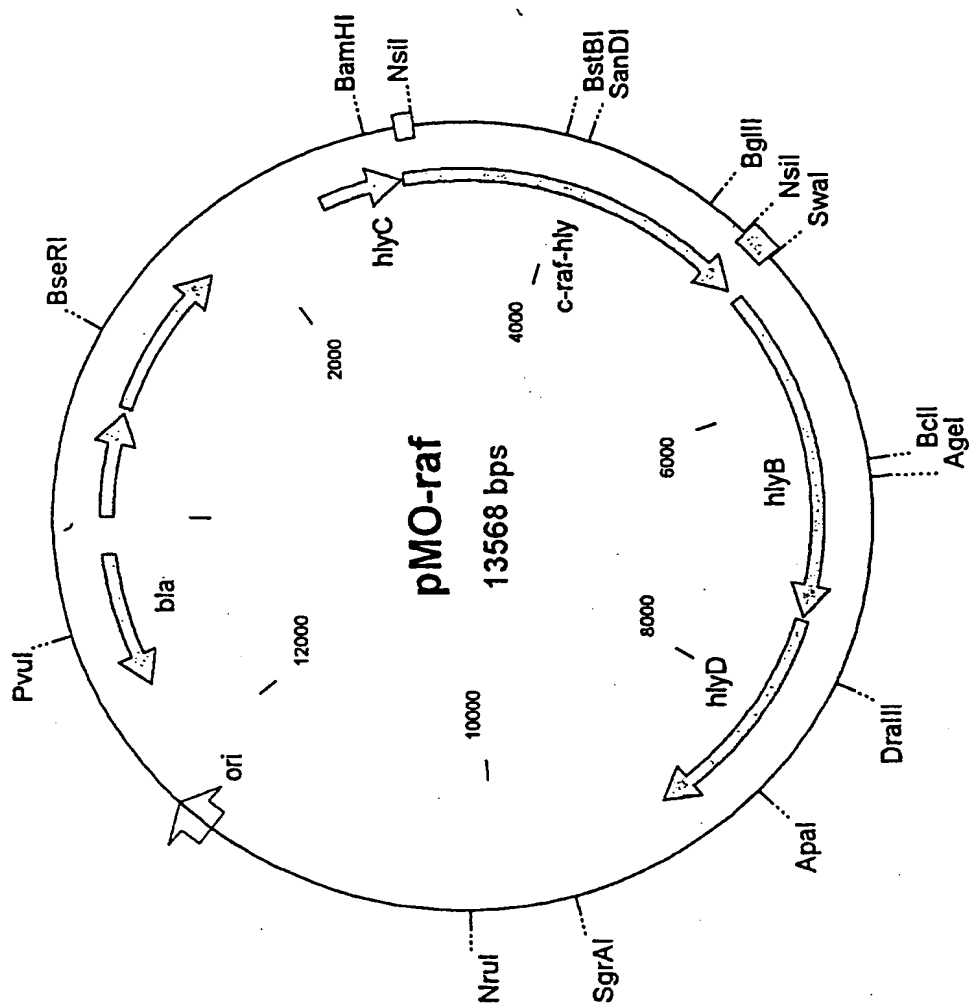
- dukts der Komponenten I) und, optional, II) auf der Außenfläche des Bakteriums und/oder die Sekretion des Expressionsprodukts der Komponente I) und, optional, der Komponente II) ermöglicht, und/oder
- IIIb) eine Nukleotidsequenz für ein Protein zur Lyse der Mikroorganismen im Cytosol von Säugerzellen und zur intrazellulären Freisetzung von Plasmiden enthalten in den lysierten Mikroorganismen, und
- IV) eine Aktivierungssequenz zur Expression einer oder mehrerer der Komponenten I) bis IIIb) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "in dem Mikroorganismus aktivierbare, gewebezellspezifische, und nicht zellspezifische Aktivierungssequenz", wobei jede der Komponenten I) bis IV) einfach oder mehrfach, jeweils gleich oder verschieden, eingerichtet sein kann.
2. Mikroorganismus nach Anspruch 1, wobei der Mikroorganismus ein Virus, ein Bakterium, insbesondere ein gram-positives oder gram-negatives Bakterium, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Escherichia coli, Salmonella, Yersinia enterocolitica, Vibrio cholerae, Listeria monocytogenes, und Shigella", oder ein einzelliger Parasit ist, wobei die Virulenz des Mikroorganismus vorzugsweise reduziert ist.
3. Mikroorganismus nach Anspruch 1, wobei der Mikroorganismus die Hülle eines Bakteriums ist.
4. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Komponente I) eine Nukleotidsequenz ist, welche für ein Epitop oder mehrere Epitope eines Antigens oder mehrerer Antigene eines Proteins oder mehrerer Proteine, optional mutiert, einer Tumorzelle kodiert, wobei dieses Protein vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "extrazellulärer, transmembraner oder intrazellulärer Teil eines Rezeptors; extrazellulärer, transmembraner oder intrazellulärer Teil eines Adhäsionsmoleküles; signaltransduzierendes Protein; ein die Zellteilung kontrollierendes Protein; Transkriptionsfaktor; Differenzierungsprotein; embryonales Protein; und virales Protein", wobei das Protein vorzugsweise ein Onkogenprodukt oder ein Suppressorgenprodukt, insbesondere c-Raf, A-Raf, B-Raf oder ein homologes Protein von c-Raf, A-Raf oder B-Raf, ist.
5. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Komponente I) eine Nukleotidsequenz ist, welche für ein Antigen kodiert, welches spezifisch ist für die Gewebezelle, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Schilddrüse, Brustdrüse, Speicheldrüse, Lymphdrüse, Brustdrüse, Magenschleimhaut, Niere, Ovar, Prostata, Cervix, Harnblasenschleimhaut und Muttermal", von welcher der Tumor stammt.
6. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5, mit einer Komponente I) nach Anspruch 4 und einer Komponente I) nach Anspruch 5.
7. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Komponente II) kodiert für mindestens ein Cytokin, Interleukin, Interferon und/oder Chemokin.
8. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Komponente IIIa) kodiert für das Hämolysintransportsignal von Escherichia coli, für das S-Layer (Rsa A) Protein von Caulobacter crescentus, oder für das TolC-Protein von Escherichia coli.
9. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Komponente IIIb) kodiert für ein lytisches Protein von gram-positiven Bakterien, für ein lytisches

Protein von Listeria monocytogenes, für PLY551 von Listeria monocytogenes und/oder für das Holm von Listeria monocytogenes.

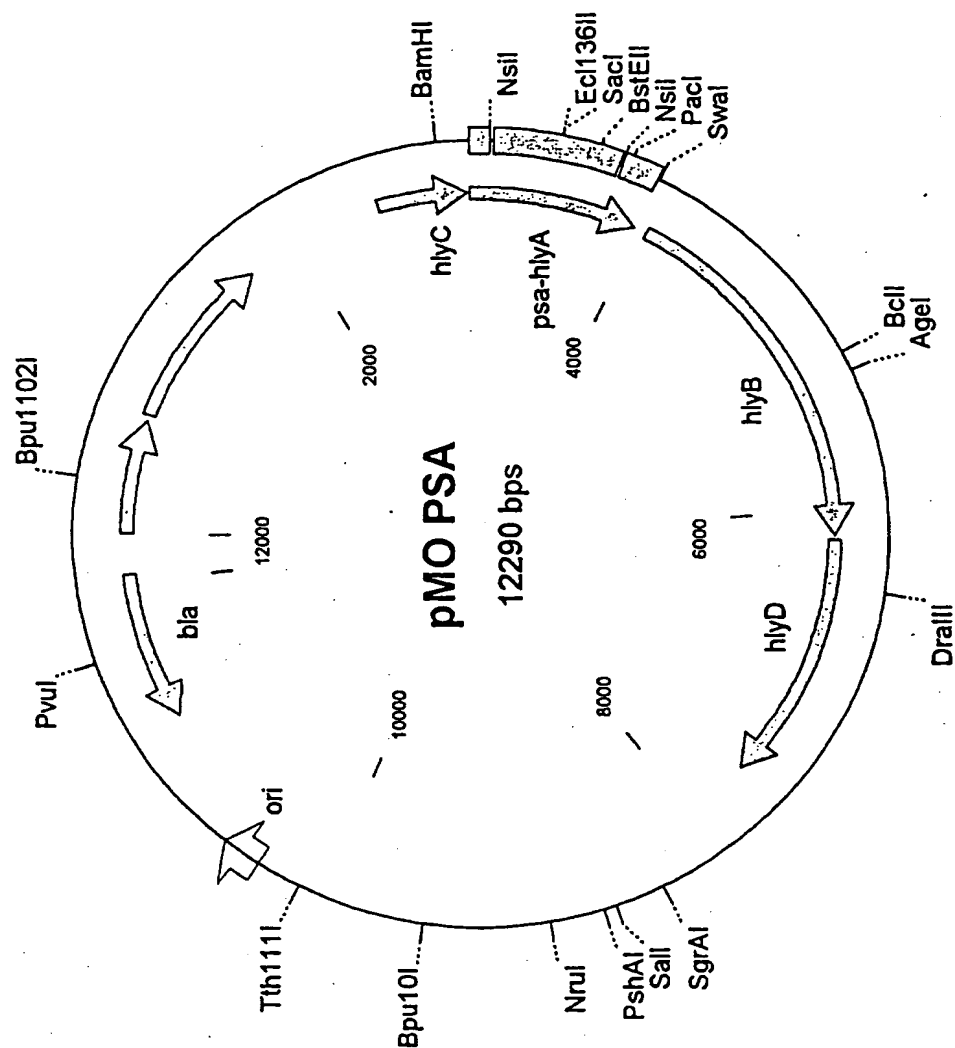
10. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Komponente IV) kodiert für eine Aktivatorsequenz, aktivierbar im Mikroorganismus, insbesondere kodiert für eine tumorzellspezifische, gewebezellspezifische, makrophagenspezifische, dendritenspezifische, lymphozytenspezifische, funktionsspezifische oder nichtzellspezifisch aktivierbare Aktivatorsequenz.
11. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bei welchem Komponente I) für mindestens zwei unterschiedliche Proteine kodiert.
12. Verwendung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 11 für die Herstellung eines Arzneimittels insbesondere zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Erkrankung, welche verursacht wird durch eine unkontrollierte Zellteilung oder eine Infektion, vorzugsweise einer Tumorerkrankung, insbesondere eines Prostatakarzinoms, eines Ovarkarzinoms, eines Mammakarzinoms, eines Magenkarzinoms, eines Nierentumors, eines Schilddrüsentumors, eines Melanoms, eines Cervixtumors, eines Harnblasentumors, eines Speicheldrüsentumors oder eines Lymphdrüsentumors, einer Leukämie, einer viralen oder bakteriellen Infektion, einer chronischen Entzündung, einer Organabstoßung und/oder einer Autoimmunerkrankung.
13. Verwendung nach Anspruch 12 für die Entfernung eines Tumors wie auch des gesunden Gewebes, von welchem der Tumor stammt.
14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, wobei das Arzneimittel für die lokale, parenterale, orale oder rektale Verabreichung hergerichtet ist.
15. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei ein Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 11 in physiologisch wirksamer Dosis mit einem oder mehreren physiologisch verträglichen Trägerstoffen zur oralen, i. m., i. v., i. p., rektalen oder lokalen Gabe hergerichtet wird.
16. Plasmid oder Expressionsvektor enthaltend die Komponenten I) bis IV) gemäß Anspruch 1.
17. Verfahren zur Herstellung eines Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei ein Plasmid oder Expressionsvektor nach Anspruch 16 erzeugt und mit diesem Plasmid oder Expressionsvektor ein Mikroorganismus transformiert wird.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



FIGUR 1



FIGUR 2